



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

COORDINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXISOMAL Y MITOCONDRIAL EN LA ADAPTACIÓN A ESTRÉS OSMÓTICO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2015/2016

Autor: **Joan Espí Bardisa**

Tutora académica UPV: **María Desamparados Pascual-Ahuir Giner**

VALENCIA, JULIO 2016



TÍTULO: COORDINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXISOMAL Y MITOCONDRIAL EN LA ADAPTACIÓN A ESTRÉS OSMÓTICO

RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo importante para entender las bases moleculares y fisiológicas de la adaptación de las células a estreses ambientales. En el caso de alteraciones de la salinidad y/o osmolaridad del entorno de la célula se han definido ya algunos parámetros de la compleja adaptación celular. El estrés hiperosmótico causa/activa varios mecanismos celulares: la biosíntesis y acumulación de osmolitos como el glicerol; la parada regulada en el ciclo celular; la modulación global de la expresión génica (activación de genes de “defensa” y represión de genes “housekeeping”) y otros. Recientemente ha sido comprobado por este grupo de investigación que la biomasa y actividad de orgánulos como mitocondrias o peroxisomas aumenta considerablemente en respuesta a estrés salino. Al mismo tiempo, mutantes con defectos en la biogénesis de los dos orgánulos demuestran fenotipos de sensibilidad al estrés.

La principal función de los peroxisomas en levadura es la β -oxidación de los ácidos grasos. Su producto final, acetil-Coenzima A, es introducido a la mitocondria donde sirve de precursor para el ciclo de Krebs y la generación de ATP vía la fosforilación oxidativa. La activación peroxisomal podría ser un mecanismo para compensar una disminución de la ruta glicolítica durante el estrés. Recientemente se ha descrito en levadura que existe un cierto grado de colocalización de peroxisomas con mitocondrias. En este trabajo queremos investigar si la activación peroxisomal condiciona la estimulación de la actividad mitocondrial y si el aumento de la biomasa y número de orgánulos ocurre dentro de la célula de un modo coordinado.

Como aproximaciones se emplearon la microscopía confocal y el ensayo bioquímico de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) para determinar la posible interconexión de peroxisomas y mitocondrias, al nivel de la distribución intracelular de los orgánulos y de la activación de la actividad respiratoria durante la adaptación celular a estrés osmótico.

Palabras clave: Peroxisoma; Mitocondria; Estrés osmótico; Succinato Deshidrogenasa; *Saccharomyces cerevisiae*

Autor: D. Joan Espí Bardisa

Localidad y fecha: Valencia, mes de Julio 2016

Tutora académica: Prof. Dña. María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG: Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc) – Compartir igual

TITLE: COORDINATION OF THE PEROXISOMAL AND MITOCHONDRIAL ACTIVITY IN THE ADAPTATION TO OSMOTIC STRESS

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an important model to understand the molecular and physiological basis of the adaptation of cells to environmental stress. In the case of alterations in salinity and/or osmolarity, some parameters of the complex adaptation of the cell have been defined already. Hyperosmotic stress triggers the biosynthesis and accumulation of osmolytes like glycerol, a regulated stop in cell cycle, global modulation of gene expression (activation of "defense" genes and repression of "housekeeping" genes) and others. Recently we have confirmed that the biomass and activity of organelles such as mitochondria or peroxisomes increase considerably in response to salt stress. At the same time, mutants with defects in the biogenesis of the two organelles show stress sensitivity phenotypes.

The main function of peroxisomes in yeast is the β -oxidation of fatty acids. Its final product, acetyl-coenzyme A, is then introduced into the mitochondria where it serves as a precursor to the Krebs cycle and ATP generation via oxidative phosphorylation. Peroxisomal activation may be a mechanism to compensate for a decrease in the glycolytic pathway during stress. Furthermore, it has been recently described in yeast that a certain degree of colocalization exists between peroxisomes and mitochondria. In this work we will investigate whether peroxisomal activation is a prerequisite for the stimulation of mitochondrial activity, and whether the increase in biomass and number of the two organelles within the cell occurs in a coordinated fashion.

The approach in this essay will use confocal microscopy and the assay of the activity of the enzyme succinate dehydrogenase (SDH) in order to investigate the possible interconnection of peroxisomes and mitochondria, at the level of the intracellular distribution of the organelles and the activation of the respiratory activity during cell adaptation to stress.

Key words: Peroxisomes; Mitochondria; Osmotic Stress; Succinate Dehydrogenase; *Saccharomyces cerevisiae*.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis tutores, Markus y Payo, que me hayan dejado entrar en la pequeña familia que es su grupo de investigación. Nunca he tenido unos jefes tan buenos y comprensivos, he aprendido muchísimo y lo que es mejor, he disfrutado del proyecto como un niño con un juguete nuevo. Nunca me olvido de los profesores que me han dejado huella, por eso sé que nunca me olvidaré de vosotros.

Quisiera dar las gracias a los compañeros y compañeras del laboratorio, por hacer que todo resultase un poco más ameno. A Alba por enseñarme que se puede dejar el listón bien alto allá a donde vayas, y ya de paso por haberme descubierto lo que es la defensa de una tesis; a Helena por los ánimos que me transmitía cuando yo le pedía algún consejo para la exposición del TFG en los momentos que coincidimos tomando café, y a Adri por haber compartido risas y peripecias con el incubador mientras hacíamos nuestro trabajo. Como no mencionar también al grupo de Pascual, nuestros vecinos de laboratorio, con los que tantas veces hemos coincidido a la hora de comer. A Ada, Carla, Miguel, Pablo, Ana, Eva y Carmen, muchas gracias por las risas y por los buenos consejos que me habéis dado.

Este proyecto pone punto y final a una de las mejores etapas de mi vida, que hubiese sido muy distinta sin todos mis compañeros del grado, por eso hago una mención especial a todos ellos. Me llevo amigos que son para toda la vida, e incluso a una persona que ha decidido quererme como yo la quiero a ella. Ha sido inigualable, tenemos tantas historias que contar juntos que podríamos escribir un libro, pero no os preocupéis, escribiremos más en el futuro, estoy seguro. Gracias a todos, de verdad.

A Sara li l'escric en Valencià perquè es l'idioma en el que sempre parlem nosaltres. Que dir de la persona que em donà la benvinguda quan encara no tenia ni idea de que aniria el projecte i m'ha acompanyat fis a hui mateixa, quan estic a punt d'acabar la meua memòria. Va a ser veritat que els superherois no duen capa. En la vida havia conegut a una persona amb tantes ganes i tan treballadora com tu. Em tornava boig sols de pensar en com podies dur endavant la tesi doctoral i la teua pròpia escola de tenis en Alaquàs, i tot sent cent vegades més organitzada que jo. M'has ajudat tant dia a dia, a la vegada que m'anaves contant les teues anècdotes, que t'he anat agafant estima, i ara se que no m'equivoque al dir que et trobaré a faltar. Se que tot t'anirà be, per que lo teu no es qüestió de sort sinó de actitud front a la vida, per això no cal que et desitje sort, se que algú com tu, treballadora i honesta, arribarà tan lluny com s'ho propose.

A la meua família per estar sempre ahí, inclús quan el vent no bufa de cara, en especial als meus pares per haver-me donat el millor regal del mon, el meu germà. I que dir també a la meua Alba... Gracies per ser la llum que em guiava quan tot pareixia fosc, gracies per ser la meua espenta quan em fallaven les forces i gracies per tindre els ulls blaus més preciosos que he vist en ma vida. Soc adicte a tu, per com eres, per qui eres i pel que dones al mon sense esperar res a canvi. Quan siga xicotet vuic ser tan adorable com tu i quan creixga vuic heretar la teua força. Des que et conec no tinc por de res, porque se que mentre estiguem junts tot anirà be. Amb tu estrella meua, per sempre...

Índice

1	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 ESTRÉS OSMÓTICO EN LEVADURA.....	1
	1.1.1 Consideraciones generales.....	1
	1.1.2 Efectos del estrés osmótico sobre la célula de levadura.....	1
	1.1.3 Respuesta al estrés osmótico en células de levadura.....	2
	1.2 MITOCONDRIA EN LEVADURA.....	3
	1.2.1 Respuesta a osmoestrés en mitocondria.....	4
	1.3 PEROXISOMAS EN LEVADURA.....	5
	1.3.1 Respuesta a osmoestrés en peroxisomas.....	5
	1.4 RELACIÓN ENTRE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIA.....	6
2	OBJETIVOS.....	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
	3.1 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE BACTERIAS.....	9
	3.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LEVADURA.....	9
	3.3 PLÁSMIDOS.....	10
	3.4 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA.....	11
	3.4.1 Extracción de material genético (Mini-Prep).....	11
	3.4.2 Digestión.....	11
	3.4.3 Electroforesis.....	12
	3.4.4 Transformación (Simple y Doble).....	12
	3.5 ANÁLISIS DE ESTRÉS OSMÓTICO EN MICROSCOPÍA CONFOCAL.....	13
	3.5.1 Preparación de precultivos.....	13
	3.5.2 Tratamiento Salino (NaCl 1M).....	13
	3.5.3 Microscopía confocal.....	13
	3.6 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	14
	3.6.1 Obtención de la fracción proteica celular.....	14
	3.6.2 Ensayo bioquímico de la actividad SDH.....	14
	3.6.3 Cuantificación de proteína mediante el método Bradford.....	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
	4.1 FUNCIÓN DE LOS PEROXISOMAS EN LA FORMACIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL.....	17
	4.1.1 Visualización de la mitocondria con dsRed y los peroxisomas con GFP bajo estrés osmótico.....	17
	4.1.2 Visualización de la mitocondria con GFP bajo estrés osmótico.....	18
	4.2 FUNCIÓN DE LOS PEROXISOMAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.....	20
	4.2.1 Actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta a estrés osmótico en levadura.....	20
	4.3 ESTUDIO DE LA COLOCALIZACIÓN DE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIA.....	22
	4.3.1 Aumento del número de peroxisomas y colocalización con mitocondria en respuesta a estrés salino.....	22
5	CONSIDERACIONES FINALES.....	25

6	CONCLUSIONES.....	27
7	BIBLIOGRAFÍA.....	28

Índice de figuras

Figura 1. La actividad enzimática SDH aumenta bajo estrés salino (Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2009).....	4
Figura 2. Interacción entre peroxisoma y mitocondria (Cohen et al., 2014).....	6
Figura 3. Visualización de los peroxisomas y la red mitocondrial de las cepas mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ en condiciones control y bajo estrés salino.	17
Figura 4. Visualización de la mitocondria con GFP bajo estrés osmótico.....	19
Figura 5. Actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta a estrés osmótico en levadura.....	20
Figura 6. Visualización de la cepa Wt (BY4741) de <i>S. cerevisiae</i> transformada con los plásmidos pVT100U-mtGFP y pTPI1-HcRed-PTS1 en condiciones control (sin estrés).	22
Figura 7. Visualización de los peroxisomas y la red mitocondrial de la cepa silvestre en condiciones control y bajo estrés salino.	23
Figura 8. Conteo del número de peroxisomas de las células de levadura Wt.	24
Tabla 1. Cepa de levadura silvestre y mutantes de delección usados durante el trabajo.....	9
Tabla 2. Plásmidos y enzimas de restricción usados para realizar la digestión.....	11

ABREVIATURAS

- Δ pex3**: delección del gen de levadura PEroXin
- Δ pex19**: delección del gen de levadura PEroXisome related
- ADN**: Ácido Desoxirribonucleico
- Agua MiliQ**: Agua desionizada
- ATP**: Adenosina trifosfato
- FAD**: Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)
- FADH₂**: Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)
- GFP**: Proteína fluorescente verde
- H₂O₂**: Peróxido de hidrógeno o “agua oxigenada”
- HOG**: Glicerol de alta osmolaridad (“High Osmolarity Glicerol”)
- KCl**: Cloruro de potasio
- LEU2**: aminoácido leucina
- MAP quinasas**: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- Na⁺**: catión sodio
- NaCl**: Cloruro de sodio o “sal común”
- O₂**: Oxígeno molecular
- Om14**: Proteína de la membrana externa mitocondrial 14
- PTS1**: Péptido de señalización peroxisomal
- ROS**: especies reactivas de oxígeno
- SD**: medio de cultivo “Synthetic Dextrose”
- SDH**: Succinato deshidrogenasa
- TDH3**: Deshidrogenasa de la triosa-fosfato
- URA3**: nucleótido uracilo
- Wt**: “Wild type” o cepa silvestre
- YPD**: medio de cultivo “Yeast extract – Peptone – Dextrosa”

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRÉS OSMÓTICO EN LEVADURA.

1.1.1 Consideraciones generales.

Se considera estrés a cualquier cambio en el ambiente que altere las condiciones fisiológicas normales de la célula y obligue a esta a adaptarse y producir una respuesta para sobrevivir. Para poder adaptarse a las nuevas condiciones que la rodean, la célula ha de poseer un mecanismo de percepción que le permita elaborar una respuesta adecuada, para así poder crecer y proliferar en este nuevo entorno.

Para la realización del presente ensayo se decidió trabajar con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Esto es debido a que la levadura *S. cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular, metodológicamente accesible, que permite el estudio de la adaptación al estrés ofreciendo datos de interés que se podrían extrapolar a organismos superiores ya que sus procesos biológicos básicos se encuentran conservados entre eucariotas superiores y la levadura.

En la respuesta celular al estrés existen diversas etapas, entre las cuales se encuentra la fase de percepción, que originaría una cascada de señalización para dar paso a la siguiente etapa, y la fase de adaptación, en la que la célula elaboraría una respuesta para prevenir los posibles efectos degenerativos y reparar los daños sufridos.

1.1.2 Efectos del estrés osmótico sobre la célula de levadura

En condiciones normales, para mantener un volumen celular adecuado en células de levadura además de un ratio de agua libre/enlazada favorable para reacciones bioquímicas, el potencial químico de agua libre en solución (o actividad de agua, a_w), debe mantenerse más baja en el interior celular que en el exterior (Hohmann, 2002). De esta forma, se mantiene una fuerza constante que conduce el agua hacia el interior celular, siendo esta fuerza contrarrestada por la presión de turgencia, la cual está establecida por la habilidad limitada de expandirse de la membrana plasmática y sobre todo la pared celular (Blomberg and Adler, 1992).

En el presente estudio se ha analizado el efecto del estrés osmótico en las células de levadura y la respuesta a este ejercida por la mitocondria y los peroxisomas. El estrés osmótico (estrés salino en nuestro caso) se debe principalmente a dos causas, la acumulación de iones como el Na^+ a concentraciones tóxicas en el medio y la carencia de agua disponible para las exigencias celulares. Bajo estas condiciones, la presión osmótica es mayor en el exterior celular, lo que provoca la pérdida de agua del citosol, ya que la membrana celular es semipermeable y permite el paso de agua para intentar igualar las concentraciones a ambos lados.

La deshidratación causa numerosos daños en la célula, principalmente afecta a la estructura, permeabilidad y propiedades mecánicas de la membrana plasmática (Wood, 2006). El exceso de sal altera la regulación de la síntesis de los ácidos grasos modificándose la conformación lipídica de la membrana plasmática. Esto tiene consecuencias a nivel de distribución, síntesis y funcionalidad de las proteínas transmembrana, transportadores y osmosensores (Carratu et al., 1996; Laroche et al., 2001).

Además, el estrés osmótico provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés), lo que conlleva un estrés oxidativo (Tomanek, 2015). Estas especies provocan la agregación y fragmentación de proteínas, bien como consecuencia de la combinación errónea de péptidos, o bien como consecuencia de los daños producidos durante la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN (Davies, 1987). Además afectan a la síntesis de aminoácidos (Berlett and Stadtman, 1997; Dean et al., 1997) y producen modificaciones perjudiciales a nivel de ADN como roturas en las hebras de doble hélice y modificaciones en las bases nitrogenadas (Cadet, 1997).

La mayor fuente de producción de ROS en la célula es la reducción incompleta de O_2 durante la respiración en la mitocondria, la cual aumenta considerablemente su actividad en respuesta a estrés osmótico (Martínez, Proft and Pascual-Ahuir, 2009). También se producen ROS durante el metabolismo de los ácidos grasos en los peroxisomas, y, en menor cantidad, en el citoplasma como consecuencia del desajuste de algunas reacciones metabólicas.

La activación de la respiración es un importante factor en la respuesta al estrés oxidativo. Las células que crecen en medios no fermentables (glicerol o etanol) y como consecuencia están obligadas a respirar, son más resistentes a agentes que causan estrés oxidativo, como la menadiona y el H_2O_2 que aquellas que crecen en medios ricos en glucosa (Jamieson, 1992). Aunque también es cierto que el nivel basal de producción de ROS es mayor en las células que crecen en medios no fermentables, cuando se las somete a estrés presentan mayor capacidad de respuesta. Si las cantidades de ROS que se generan en la célula superan su capacidad de detoxificación, se producen daños a nivel celular pudiendo llegar a ser suficientemente graves como para activar procesos apoptóticos (Matsuyama and Reed, 2000).

1.1.3 Respuesta al estrés osmótico en las células de levadura

El mecanismo de supervivencia ha de actuar en los primeros segundos después de un cambio osmótico repentino, porque la pérdida pasiva de agua es un proceso muy rápido, de aproximadamente un minuto, que se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que esta acumula iones tóxicos del citoplasma (Serrano, 1996). La osmorregulación se define como el control activo del equilibrio entre el agua del interior y el exterior de la célula, y abarca todos los mecanismos para mantener la homeostasis celular.

La adaptación a un estrés hiperosmótico es un proceso activo basado en la detección de cambios osmóticos y elaboración de respuestas celulares apropiadas enfocadas a

mantener la actividad celular. La acumulación de osmolitos químicamente inertes, principalmente el glicerol, juega un papel central en la osmoregulación en levadura, de ahí la importancia de la ruta HOG ("High Osmolarity Glicerol") (Schüller et al., 1994).

La mayor ruta de transducción de señales en levadura que se activa específicamente bajo estrés hiperosmótico, es la de "High Osmolarity Glycerol" MAP quinasas. Las respuestas reguladas por esta ruta son complejas y comprenden la regulación directa de transportadores de membrana catiónicos, la regulación de la síntesis proteica, el control de la detención del ciclo celular durante el estrés, la activación transcripcional de muchos genes de respuesta a estrés y la producción de osmolitos como adaptación a largo plazo.

1.2 MITOCONDRIA EN LEVADURA

La mitocondria fue visualizada bajo el microscopio por primera vez en 1884 por Altmann. En 1897 se acuñó el término mitocondria, que deriva del griego *mitos* (hilo) y *chondros* (gránulo).

Este orgánulo semiautónomo que dispone de su propio programa de biogénesis se localiza en el citoplasma de las células eucariotas. Dispone de su propio material genético, varias copias de ADN circular de doble hebra, que a pesar de presentar relativamente pocos genes, abarca todas las funciones mitocondriales y su propia biogénesis (Foury et al., 1998).

A nivel estructural, la mitocondria está formada por dos membranas de composición estructura y disposición diferentes, la membrana externa y la membrana interna. Estas dos membranas generan la existencia de dos compartimentos distintos dentro de la mitocondria: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. A lo largo de la membrana interna existen fragmentos conectados con la membrana externa y otros que se pliegan, formando invaginaciones a las que se les denomina crestas mitocondriales, y que se disponen formando estructuras lamelares por tal de aumentar la superficie de la membrana (Alberts, 2002).

El tamaño, la forma, la localización e incluso el número de mitocondrias por célula pueden variar dependiendo del estado metabólico y energético en el que se encuentre la célula. Existe la creencia de que *S. cerevisiae* solamente contiene una mitocondria por célula, aunque esta puede encontrarse partida o ramificada, formando la llamada red mitocondrial, como consecuencia de su constante modificación morfológica (Stevens and Chan, 1981).

La mitocondria es el principal orgánulo generador de ATP en las células eucariotas. Además, de su función como proveedor de energía celular mediante fosforilación oxidativa, la mitocondria tiene un papel fundamental en el metabolismo secundario, en la señalización del calcio, en la homeostasis de las especies redox y en apoptosis. Interesantemente, la mitocondria ha sido caracterizada como un orgánulo mucho más dinámico de lo que se creía en un principio, ya que su actividad metabólica, biomasa y morfología se encuentran en continuo cambio (Chan, 2006; Detmer and Chan, 2007).

1.2.1 Respuesta a osmoestrés en mitocondria

La función mitocondrial es requerida para una adaptación adecuada al estrés salino ya que diversos estudios muestran que los mutantes con diferentes defectos en componentes mitocondriales muestran hipersensibilidad frente a este, y además se produce la hiperacumulación de ROS a concentraciones elevadas de NaCl y KCl (Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2009). La concentración de proteínas mitocondriales aumenta rápidamente de manera selectiva frente a un osmoshock a diferencia de en el cambio diauxico (Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2010), donde se produce el cambio de fermentación a respiración y se produce un aumento generalizado de todas las proteínas de la mitocondria. Por eso, tanto la función antioxidante de la mitocondria como su capacidad de generar energía en forma de ATP juegan un papel importante en la adaptación al estrés hiperosmótico.

Tomando como precedente que existe una regulación de la mitocondria a nivel transcripcional en respuesta a estrés osmótico, en estudios anteriores realizados por este grupo de investigación se realizó un ensayo de la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa (SDH) para estudiar si el estrés hiperosmótico causaba cambios en la funcionalidad de la mitocondria. La SDH cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs por lo que se emplea como marcador de la actividad mitocondrial. Se observó que la cepa silvestre BY4741 bajo tratamiento con estrés osmótico mostraba una actividad enzimática de 2,5 veces mayor que en las células cultivadas en condiciones normales (Fig. 1)(Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2009)

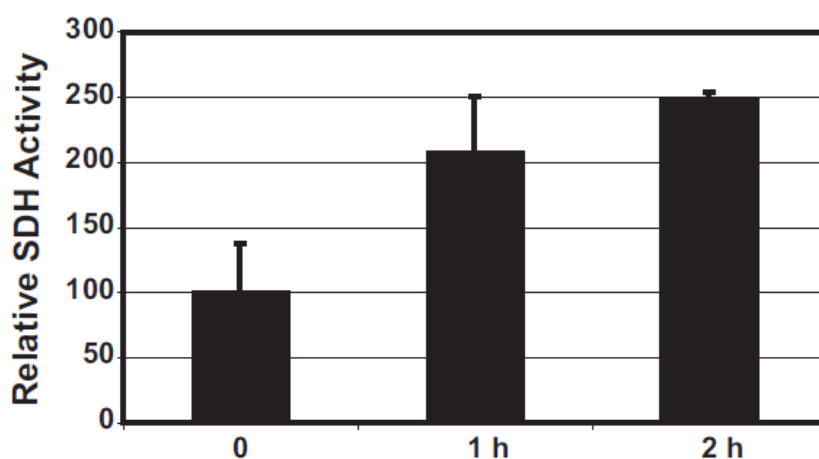


Figura 1. La actividad enzimática SDH aumenta bajo estrés salino. (Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2009) Células de la cepa silvestre de levadura fueron crecidas en YPD (0) o sometidas a un choque salino (0,4 M NaCl) durante una y dos horas. La actividad enzimática SDH fue medida a partir de extractos celulares enriquecidos en la fracción mitocondrial, y la actividad basal fue establecida arbitrariamente a 100. La actividad SDH fue medida por duplicado en tres cultivos independientes.

Este resultado se aprovechó en este trabajo para diseñar una serie de experimentos que tenían como objetivo estudiar la implicación peroxisomal en la adaptación a estrés osmótico.

1.3 PEROXISOMAS EN LEVADURA

Los peroxisomas son unos orgánulos esféricos que presentan una única membrana y que se encuentran distribuidos por toda la célula eucariota. Estos orgánulos participan en diversas rutas del metabolismo celular, como por ejemplo en la β -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos y la detoxificación de ROS (Wanders and Waterham, 2006). En la levadura *S. cerevisiae* los peroxisomas son los únicos orgánulos capaces de realizar la β -oxidación de los ácidos grasos.

Debido a su papel central en el desarrollo de las funciones celulares, su disrupción o mal funcionamiento lleva a desordenes y enfermedades severas (Braverman, D'Agostino and MacLean, 2013). Los peroxisomas son notablemente diferentes en tamaño, número y carga enzimática que contienen dependiendo del tipo celular y las condiciones ambientales a las que se enfrente la célula. Además todas estas características pueden cambiar rápidamente en respuesta a diversas señales metabólicas.

1.3.1 Respuesta al osmoestrés en peroxisomas

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación demuestran que, en respuesta a estrés osmótico, se induce la expresión de todos los genes relacionados con la β -oxidación de los ácidos grasos y aumenta el número de peroxisomas en la célula (Manzanares, Proft and Pascual-Ahuir, observaciones no publicadas). Estos resultados indican que la función peroxisomal es de algún modo necesaria para la adaptación al exceso de sal en el medio, por ello nos resultó interesante estudiar en este trabajo la relación entre la mitocondria y los peroxisomas en la adaptación a estrés salino, ya que ambos orgánulos intervienen de alguna forma en la supervivencia a este estrés. El análisis de la colocalización entre estos dos orgánulos para dilucidar su interacción física y el estudio de la actividad respiratoria en presencia y ausencia de peroxisomas, a nivel metabólico, han sido algunos de los puntos clave que se han estudiado en este ensayo.

1.4 RELACIÓN ENTRE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIA.

Nuevas evidencias muestran que la regulación de la función peroxisomal también tiene lugar a través de rutas de comunicación entre peroxisomas y otros orgánulos (Smith and Aitchison, 2013). Un orgánulo que ha demostrado tener una correlación mayor de la anticipada con los peroxisomas es la mitocondria (Thoms, Gronborg and Gartner, 2009; Mohanty and McBride, 2013). La mitocondria y los peroxisomas están relacionados metabólicamente a través del acetil-CoA, ya que esta molécula es el producto final de la β -oxidación y a su vez es el punto de partida del ciclo del ácido cítrico mitocondrial para la producción de energía. En los últimos años se ha visto que se produce una comunicación cruzada entre estos dos orgánulos en el mantenimiento de niveles adecuados de ROS y en la β -oxidación de los ácidos grasos.

En las células de mamíferos la β -oxidación de los ácidos grasos se da tanto en mitocondria como en peroxisomas, sin embargo, como ya se ha comentado, en *S. cerevisiae* esta se produce únicamente en los peroxisomas. Ya que en levadura los procesos catabólicos de producción de energía tienen lugar únicamente en los peroxisomas (β -oxidación) y en la mitocondria (Ciclo de Krebs), tal y como se muestra en la Figura 2, estos procesos han de estar corregulados para satisfacer las necesidades energéticas de la célula. A la vista de esta estrecha relación, era de esperar que se encontrasen más puntos en común entre ambos orgánulos, como por ejemplo la maquinaria de fisión y diferentes enzimas metabólicas (Ast et al., 2013). Sorprendentemente una ruta de transporte vesicular de la mitocondria a los peroxisomas fue identificada en células de mamíferos (Neuspiel et al., 2008). Además hay evidencias que muestran que en diversos desordenes peroxisomales las mitocondrias son deficientes.

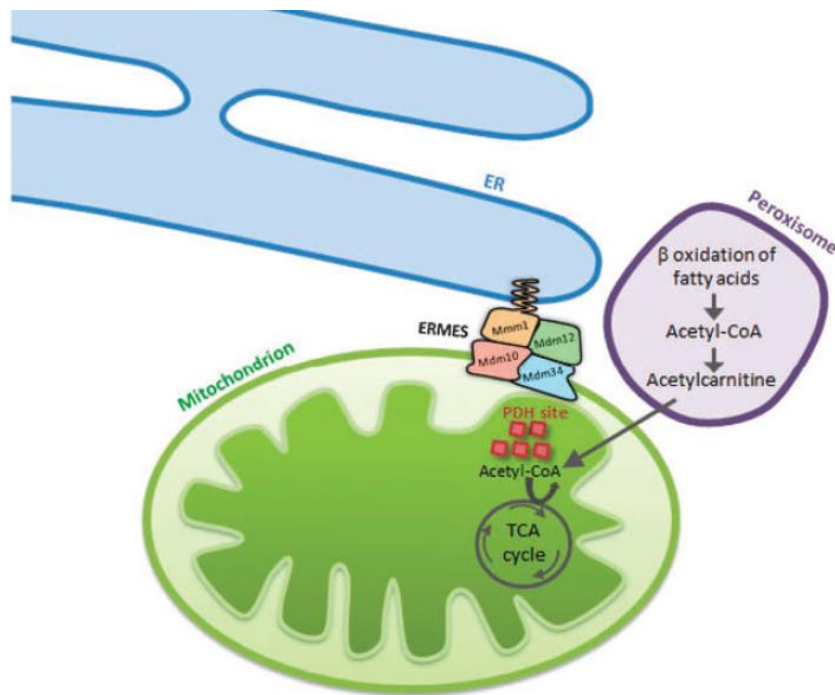


Figura 2. Interacción entre peroxisoma y mitocondria (Cohen et al., 2014).

En la figura se muestra la interacción metabólica entre el peroxisoma (orgánulo representado en morado) y la mitocondria (en verde). El esquema muestra que los peroxisomas se encuentran adyacentes a los sitios de síntesis de acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH) en la mitocondria. Hay que tener en cuenta que el acetil-CoA puede entrar en la mitocondria como molécula adicional a parte de la acetilcarnitina. Además se muestra la interacción de la mitocondria con el retículo endoplasmático (en azul) a través del complejo ERMES ("Endoplasmatic Reticulum/Mitochondria Encounter Structure").

Ya que se conoce poco sobre la interacción específica entre peroxisomas y mitocondria frente a diversas condiciones metabólicas, en el presente estudio se decidió estudiar la interacción entre estos dos orgánulos en la adaptación a estrés osmótico. Para ello se analizó la actividad de la enzima SDH en las cepas mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$, deficientes en genes esenciales para la ruta de biogénesis peroxisomal, por comprobar si se comportaban de forma similar a la cepa silvestre o mostraban un fenotipo distinto, dando a entender que la presencia de los peroxisomas es necesaria de algún modo para llevar a cabo esta adaptación al choque osmótico. Además también se visualizaron las distintas cepas (Wt, $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$) transformadas bajo microscopía confocal para estudiar la interacción física entre nuestros orgánulos de interés y analizar el posible aumento de la colocalización peroxisomal con la red mitocondrial en la adaptación a hieperosmolaridad del medio.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

- Estudiar el nivel de implicación de los peroxisomas en la correcta respuesta a osmoestrés llevada a cabo por la mitocondria.
- Comprobar el aumento de la mitocondria y peroxisomas frente a un estrés osmótico, tanto a nivel físico como bioquímico
- Estudiar el posible aumento de la colocalización peroxisomal con la red mitocondrial frente a un estrés osmótico.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE BACTERIAS.

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo, para el aislamiento y propagación de plásmidos, fue la cepa DH5 α (*F'* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) *deoRrecA1 endA1 hsdR17(rK-mK +)phoA supE44* λ -1 *thi-1*) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Los medios de cultivo que se emplearon para estas bacterias fueron los siguientes:

LB (Luria Bertani) líquido: Se mezcló en agua MiliQ, 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de cloruro sódico. El medio se autoclavó a 121°C durante 20 – 30 minutos.

LB (Luria Bertani) sólido: Se mezcló en agua MiliQ, 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona, 1% de cloruro sódico y 2% de agar bacteriológico. El medio se autoclavó a 121°C durante 20 – 30 minutos.

Para la selección de plásmidos, los medios se suplementaron con ampicilina (50 μ g/ml). Las bacterias se incubaron a 37°C en agitación (180 – 200 rpm).

3.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LEVADURA.

Las cepas de la levadura *S. cerevisiae* que se utilizaron en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepa de levadura silvestre y mutantes de delección usados durante el trabajo.

Cepa	Descripción	Procedencia
BY4741	(MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0)	Euroscarf
<i>Δpex3</i>	BY4741 <i>pex3::KAN</i>	(Winzeler E.A. et al. 1999)
<i>Δpex19</i>	BY4741 <i>pex19::KAN</i>	(Winzeler E.A. et al. 1999)

Los medios empleados para los cultivos de levadura *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

Medio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) líquido: se disuelve en agua MiliQ, 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa (dextrosa). Se autoclava a 121°C durante 20 – 30 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron en agitación a 28°C en agitación (180 – 200 rpm).

Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) sólido: se disuelve en agua MiliQ, 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona, un 2% de glucosa (dextrosa) y un 2% de agar bacteriológico. Se autoclava a 121°C durante 20 – 30 minutos. En este medio, los cultivos se incubaron a 28°C.

Medio SD (Synthetic Dextrose) líquido: se disuelve en agua MiliQ, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura, 20 g/l de glucosa (dextrosa) y 50 mM de ácido succínico pH=5,5. Al medio se le pueden añadir los suplementos necesarios según los requerimientos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10g/l de leucina 100x y 10g/l de metionina 100x). Se autoclava a 121°C durante 20 – 30 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron en agitación a 28°C (180 – 200 rpm).

Medio SD (Synthetic Dextrose) sólido: se disuelve en agua MiliQ, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura, 20 g/l de glucosa (dextrosa) y 50 mM de ácido succínico pH=5,5. Para solidificar el medio se añade 20 g/l de agar bacteriológico. Al medio se le pueden añadir los suplementos necesarios según los requerimientos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10g/l de leucina 100x y 10g/l de metionina 100x). Se autoclava a 121°C durante 20 – 30 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron a 28°C.

3.3 PLÁSMIDOS

Para estudiar la morfología de la red mitocondrial se utilizó el plásmido pVT100U-mtGFP, que deriva del plásmido pVT100U con marcador de selección *URA3*, y permite visualizar la mitocondria en verde bajo microscopía confocal porque se ha fusionado la proteína fluorescente verde (GFP de sus siglas en inglés) con un péptido señal para su importe a la mitocondria (Westermann and Neupert, 2000).

Para el estudio conjunto de la mitocondria y los peroxisomas se utilizaron los plásmidos pAG415-GPD-Om14-dsRed y pTPI1-GFP-PTS1, este último cedido por E. Hettema, de la Universidad de Sheffield. Estos permiten la visualización de la mitocondria en rojo y los peroxisomas en verde respectivamente, como se explicará en el apartado de microscopía confocal de materiales y métodos de este ensayo.

El plásmido pAG415-GPD-Om14-dsRed cuenta con el promotor *TDH3*, que en levadura controla la expresión del gen de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, por tanto es un promotor fuerte y constitutivo en este organismo. Este promotor precede la fusión de la proteína mitocondrial Om14 con dsRed, proteína fluorescente roja.

El plásmido pTPI1-GFP-PTS1 contiene el promotor de la enzima glicolítica triosa fosfato isomerasa, pTPI1, el cual es también fuerte y constitutivo en levadura. En el plásmido, este promotor regula la expresión de la GFP fusionada al péptido de señalización peroxisomal PTS1.

Además, se empleó el plásmido pTPI1-HcRed-PTS1, también cedido por E. Hettema, en el cual PTS1 se encuentra fusionado a HcRed, proteína fluorescente roja. Se utilizó en conjunto con pVT100U-mtGFP para comprobar si la visualización de los peroxisomas en rojo y la mitocondria en verde resultaba mejor que la combinación contraria.

3.4 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA.

3.4.1 Extracción de material genético (Mini-Prep)

Para la propagación de los plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*. La extracción del ADN plasmídico se realizó empleando el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel) a partir de 3 ml de precultivo bacteriano saturado. A continuación se describen los pasos recomendados por este kit para el aislamiento de los plásmidos de interés.

En un tubo eppendorf se pusieron 1,5 ml del cultivo de la bacteria de la cual se quiere extraer el plásmido. Se centrifugaron las células a 11.000 g durante 30 segundos y tras esta centrifugación, se descartó el sobrenadante. Los 1,5 ml restantes del precultivo se pusieron en el mismo eppendorf para realizar de nuevo otra centrifugación en las mismas condiciones. Se descartó de nuevo el sobrenadante, ya que las células se encontraban en el “pellet”. Se resuspendieron las células en 250 μ l de tampón A1 y 250 μ l de tampón A2 (tampones especificados por el kit). Mezclamos por inversión de 4 a 6 veces hasta que la solución se clarificó. Sin dejar las células más de 5 minutos en esta disolución, se añadieron 300 μ l de tampón A3 (tampón especificado por el kit) y se mezcló por inversión inmediatamente. Se centrifugó 10 minutos a 11.000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo con filtro o membrana de resina especificado por el kit. En esta membrana se adsorbe el ADN. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 g y se descartó el filtrado. Se realizó un lavado añadiendo 600 μ l de tampón de lavado A4 (tampón especificado por el kit) y se centrifugó durante 60 segundos a 11.000 g. Se descartó de nuevo el filtrado y se volvió a centrifugar durante 2 minutos en las mismas condiciones para eliminar los restos de tampón de lavado. El filtro se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadieron 50 μ l de tampón de elución AE (tampón especificado por el kit). Con este tampón se consigue eluir el ADN plasmídico adsorbido en la membrana. Se dejó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo 1 minuto. Lo que se eluyó, por lo tanto, es el plásmido de interés purificado.

La eficiencia de purificación se comprobó mediante la medida de la concentración del plásmido purificado empleando el aparato NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Y se comprobó su pureza mediante un gel de agarosa empleando tampón 1X TAE (TAE 50X: 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de 0,5 M EDTA pH 8 y agua destilada hasta 1 L).

3.4.2 Digestión

Con el objetivo de comprobar si los plásmidos extraídos se correspondían con los de interés se realizó una digestión de los mismos. Las enzimas de restricción utilizadas en cada plásmido se pueden comprobar en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos y enzimas de restricción usados para realizar la digestión.

Plásmido	Enzima/s de restricción
pVT100U-mtGFP (URA3)	BamHI
pAG415-Om14-dsRed (LEU2)	BglII, NotI
pTPI1-GFP-PTS1 (URA3) y pTPI1-HcRed-PTS1(URA3)	EcoRI

Se realizó una reacción de digestión para cada plásmido distinto. En cada tubo eppendorf se añaden 2 µl de tampón de digestión 10X comercial (Fermentas), 0,5 µl de enzima de restricción (Fermentas), 2 µl de plásmido y el volumen restante hasta 20 µl se llenó con agua MiliQ. Se dejó incubar la reacción a 37°C durante 2 horas.

3.4.3 Electroforesis.

Con tal de evaluar el tamaño de los fragmentos de restricción generados se elaboró un gel de agarosa para realizar una electroforesis. Para la preparación del gel se añadieron 50 ml de tampón TAE 1x y 0,5g de agarosa a un matraz y se calentó la mezcla hasta su ebullición. Una vez enfriado un poco se le añadieron 2 µl de Gel Red y se abocó el contenido en una cubeta de electroforesis para dejar que solidifique (20 – 30 minutos).

Una vez solidificado se coloca la cubeta en el tanque de electroforesis y se añade tampón TAE 1x hasta que el gel quede cubierto. Ahora ya está listo para añadir las muestras, 20 µl de digestión más 5 µl de loading dye 6x. En el primer pocillo se añadieron 5 µl de mass ruler ladder mix como marcador del tamaño molecular.

3.4.4 Transformación (Simple y doble)

En este trabajo se realizaron dos transformaciones, una simple, con el plásmido pVT100U-mtGFP y una doble con los plásmidos pAG415-GPD-Om14-dsRed y pTPI1-GFP-PTS1. En ambos casos se siguió el mismo protocolo: el método del acetato de litio (Gietz et al., 1995).

En primer lugar, es necesario hacer a las células de *S. cerevisiae* competentes. Para ello, se dejaron crecer cultivos de las cepas de levadura de interés en 50 ml de medio YPD líquido. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (OD_{600}) de entre 0,5 y 1,2; se transfirió su contenido a tubos Falcon de 50 ml. Se centrifugaron los tubos Falcon a 1500 rpm durante 3 minutos y se realizó un lavado con agua MiliQ estéril. Se repitió la centrifugación a 1500 rpm durante 3 min y se realizó un segundo lavado con LiTE 1X estéril. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µl de LiTE 1X estéril (0.1 M LiAcetate en 1X TE (10 mM Tris/HCl pH=7.6, 1mM EDTA)), de los cuales 60 µl fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se dejaron incubar 15 min a 30°C.

Una vez las células de levadura son competentes se puede proceder a la transformación. A los tubos Eppendorf con 60 µl de células se les añadió en el siguiente orden: 5 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml); 300 µl de LiTE/40% PEG4000 (desde un stock fresco preparado mezclando 9 volúmenes de 45% PEG4000 con 1 volumen de 10X LiTE) y 2 µl del plásmido de interés (en el caso de la doble transformación se añadieron 2 µl de cada plásmido). Se homogenizó el contenido mediante vortex y se dejó en incubación 30 min a 30°C. Posteriormente se realizó una segunda incubación durante 20 min a 42°C. Se centrifugaron las células a 8000 rpm durante 1 minuto y se lavaron con agua MiliQ estéril. Por último, se plaquearon las células ya transformadas en el medio de selección correspondiente y se dejaron incubando durante 1 - 2 días a 30°C.

3.5 ANÁLISIS DE ESTRÉS OSMÓTICO EN MICROSCOPIA CONFOCAL

3.5.1 Preparación de precultivos

Para realizar el análisis del estrés osmótico en microscopía confocal con las cepas mutantes y silvestre transformadas, primero era necesario preparar los precultivos correspondientes.

Para ello, se inoculó, directamente de la placa sólida, la cepa Wt, *Δpex3* o *Δpex19* en 3 ml de medio SD suplementado con los aminoácidos requeridos (según fuese el plásmido con el que estaban transformadas). Se dejaron en incubación a 28°C en agitación (180 rpm) hasta saturación.

3.5.2 Tratamiento Salino (NaCl 1M)

Una vez obtenidos los precultivos saturados se procede a realizar el tratamiento con NaCl 1M “overnight”. Para que el posterior análisis en microscopía sea lo más informativo posible, el objetivo es obtener los cultivos a la misma OD₆₀₀, hayan sufrido o no el tratamiento con sal. Para ello, se realizan distintas diluciones de los precultivos saturados. En el caso del tratamiento control se realizaron 5 diluciones, 0,5 μl, 1 μl, 2 μl, 5 μl y 10 μl en 3 ml de medio SD suplementado con los aminoácidos necesarios. Para el tratamiento salino se prepararon 6 diluciones distintas: se añadió a distintos tubos de precultivo 1 ml, 500 μl, 250 μl, 100 μl, 50 μl y 10 μl respectivamente, y se añadió el volumen restante hasta 3 ml de SD (suplementado con los aminoácidos necesarios) más NaCl 1M.

3.5.3 Microscopía Confocal

La fluorescencia es una propiedad que poseen ciertas sustancias, caracterizada por la capacidad de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética con una longitud de onda diferente, resultando en una luz de un color particular (Skoog, Holler and Nieman, 1998). Dicha emisión es simultánea a la absorción y no persiste tras esta. En biología molecular se emplea este fenómeno para visualizar mediante microscopía cualquier molécula (proteína, componente de membrana, etc.) que se haya fusionado a un epítipo fluorescente para estudiar su localización.

El microscopio utilizado para analizar las células de levadura fue el “Microscopio confocal Leica SP8” con el objetivo *HCXPL APO CS2 aceite*, de resolución (nm) (xy/z) 139.43 / 235,82, aumento/apertura 63x / 1,40 y distancia libre de trabajo 0,140 mm.

Para poder visualizar la GFP es necesario aplicar una longitud de onda de excitación de 487 nm. Cuando es excitada, su longitud de emisión es de 509 nm (verde). Por otro lado, la longitud de excitación de dsRed es de 557 nm y la longitud de emisión es de 585 nm (rojo). Gracias estas proteínas fluorescentes fue posible la visualización y estudio de la mitocondria o los peroxisomas según fuese el experimento.

El software utilizado para analizar las imágenes generadas ha sido el programa LAS X. Para realizar el análisis estadístico del número de peroxisomas se utilizó el programa Excel de Mricrosoft® (Versión 2010).

3.6 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la comparación a nivel bioquímico del efecto del estrés osmótico en las cepas silvestre y mutantes, se realizó una extracción proteica global y un ensayo de la actividad enzimática SDH. El procedimiento queda explicado en los puntos siguientes.

3.6.1 Obtención de la fracción proteica celular

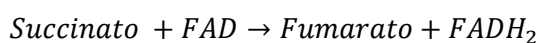
Las cepas Wt, Δ pex3 y Δ pex19 fueron crecidas hasta una OD₆₀₀ de 1 en 100 ml de YPD y se tomaron alícuotas de 50 ml de cada una. Una de las alícuotas fue considerada la control, sin estrés osmótico, y la otra fue sometida a estrés salino (0,4 M de NaCl). Las alícuotas de cada cepa (sin estrés y con estrés) fueron incubadas a 30°C en agitación durante 2 horas.

Una vez el tratamiento salino hubo finalizado se centrifugaron los 50 ml de cada cepa y condición durante 3 minutos a 1500 g. Se lavaron las células con agua MiliQ una primera vez, y con tampón A (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 15 mM EDTA; 2mM DTT; 0,1% Triton X-100; 150 mM NaCl) una segunda vez. Las células presentes en el “pellet” se resuspendieron en 1 ml de tampón A con 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) preparado fresco. El PSMF es un inhibidor de proteasas diluído en isopropanol. Una vez resuspendidas las células, se transfirió la disolución a tubos de agitación y se procedió a la disrupción celular. Para ello se añadieron bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products) a los tubos de agitación hasta la mitad aproximadamente y se utilizó el homogenizador Precellys® Evolution (Bertin Technologies).

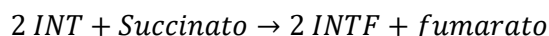
Se utilizó el protocolo de disrupción celular 4 veces realizando un descanso de un minuto en hielo entre cada repetición del protocolo. El protocolo de disrupción utilizado consistía en la agitación a 7.500 rpm durante 20 segundos dos veces, realizando un descanso de 30 segundos entre cada agitación. El protocolo estaba especificado para tubos de 2 ml de volumen. Por último, se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos, con lo que se separaron las bolas de vidrio y los restos celulares (“pellet”) del extracto global, y se recogió el sobrenadante con las proteínas de interés con cuidado para transferirlo a tubos eppendorf nuevos.

3.6.2 Ensayo bioquímico actividad SDH

Una vez obtenida la fracción citosólica, se estudió la actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa como indicador de la actividad mitocondrial. Esta cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs según la ecuación:



Se llevó a cabo un ensayo colorimétrico que utiliza cloruro de p-iodonitrotetrazolium (INT, incoloro), como agente oxidante y aceptor final de electrones, dando iodonitroformazán (INTF, rosa) según la ecuación:



El ensayo se realizó por duplicado. Tras la obtención de la fracción proteica celular se destinó una alícuota para cuantificar la cantidad de proteína mediante el método Bradford como se explicará en el siguiente apartado. Del resto de muestra se utilizó 20 µl que se añadieron a un tubo eppendorf con 300 µl de tampón succinato (10 mM de ácido succínico diluido en tampón fosfato pH 7,4 estéril (50 mM de Na₂PO₄ al que se añade 50 mM de KH₂PO₄ hasta alcanzar un pH de 7,4). La mezcla fue incubada 10 minutos a 37°C y posteriormente se añadieron 100 µl de solución INT (2,5 mg/ml de p-iodonitrotetrazolium violet (INT) en tampón fosfato a pH 7,4).

La mezcla se incubó 2 horas a 37°C y posteriormente se midió la absorbancia del formazán a 490 nm de longitud de onda (A₄₉₀) con el lector multipocillo Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer™). Esta será proporcional a la actividad de la enzima SDH, y, por tanto, a la actividad mitocondrial.

La actividad (M/min x mg) se calculó según la ecuación:

$$a = \frac{V_T \cdot A_{490}}{V_S \cdot \xi \cdot I \cdot t \cdot C_P}$$

Donde:

V_T: volumen total de la reacción

V_S: volumen de la muestra

ξ: coeficiente de extinción molar 19300 M⁻¹ cm⁻¹

I: longitud de la cubeta

t: tiempo medio en minutos del ensayo

C_P: concentración obtenida de proteína (mg/ml)

3.6.3 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford

Una vez obtenida las fracciones proteicas celulares a cada uno de los tiempos, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Se empleó para ello el reactivo 5X Bio-Rad Protein Assay (BioRad), que se utilizó diluyéndolo 5 veces. Este contiene ácido fosfórico, el cual permite que, en presencia de proteínas, el colorante Coomassie Blue G (inicialmente de color pardo), se vuelva de un color azulado con una intensidad proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Para determinar la concentración de proteína total presente, fue necesario realizar una recta de calibrado empleando un patrón proteico. A partir de dicha recta se pudo extrapolar la cantidad de

proteína presente en distintas muestras a partir de sus absorbancias. En este caso se empleó seroalbúmina bovina (BSA) como patrón. Utilizando cantidades conocidas de BSA (0, 2, 4, 6 y 10 μg), 20 μl del reactivo Bradford y agua Milli Q (hasta un volumen final en cada caso de 100 μl), se midió la absorbancia empleando el lector multipocillo Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer™). Las absorbancias de las muestras se midieron a partir de 4 μl de muestra, 76 μl de agua Milli Q y 20 μl de reactivo Bradford.

4. Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. FUNCIÓN DE LOS PEROXISOMAS EN LA FORMACIÓN DE LA RED MITOCONDRIA

4.1.1 Visualización de la mitocondria con dsRed y los peroxisomas con GFP bajo estrés osmótico

En primer lugar, se quiso estudiar la implicación de los peroxisomas en el cambio de morfología mitocondrial en respuesta a estrés osmótico. Se visualizaron las células de las cepas silvestre (WT, como control) y mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ (carentes de peroxisomas) cotransformadas con los plásmidos pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed, y se analizó el desarrollo de la red mitocondrial en condiciones control (sin estrés) y después de la aplicación de 1M de NaCl “overnight” (Fig. 3). Teniendo en cuenta que PTS1 es un péptido de señalización peroxisomal, en los mutantes carentes de estos se debe observar el color verde (GFP) disperso en el citosol celular (Eckert and Erdmann, 2003).

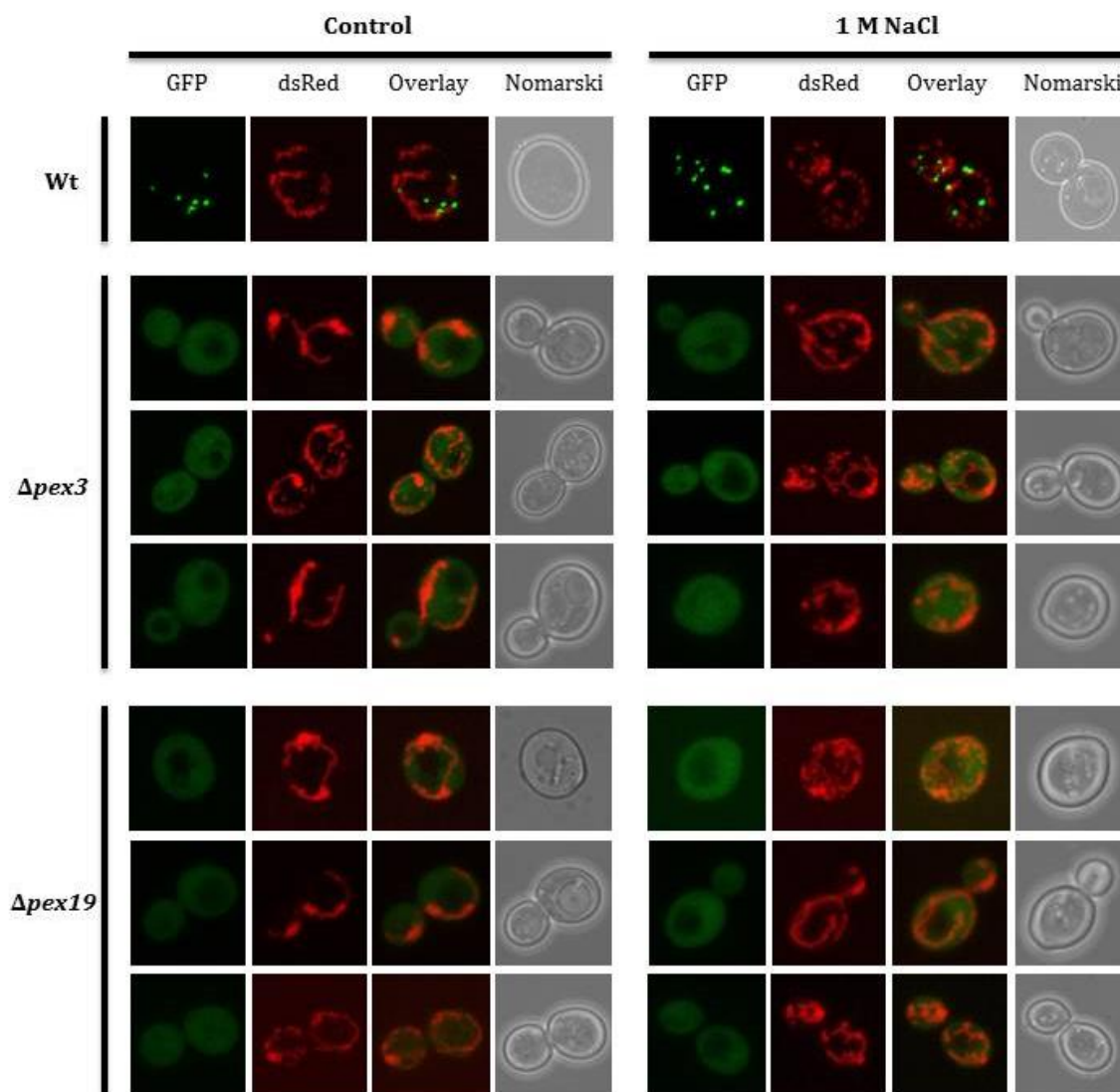


Figura 3. Visualización de los peroxisomas y la red mitocondrial de las cepas mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ en condiciones control y bajo estrés salino. Estas cepas fueron transformadas con los plásmidos pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed. En verde aparece una zona difusa en el citosol (GFP) y en rojo la red mitocondrial (dsRed) de las distintas cepas en condiciones normales (Control) y tras un tratamiento salino “overnight” con 1 M NaCl. En la figura se muestra también la superposición de los canales GFP y dsRed (Overlay) además de la imagen transmitida de las células de levadura (Nomarski). Se muestra también la cepa Wt (BY4741) transformada con los mismos plásmidos y bajo las mismas condiciones para poder comparar el fenotipo salvaje (presencia de peroxisomas en el canal GFP) con el mutante.

Las imágenes de la Figura 3 muestran que efectivamente los mutantes carecen de peroxisomas (en verde) a los que se pueda anclar el péptido de señalización PTS1, por tanto, su señal aparece dispersa en el citosol. Por el contrario, en la cepa silvestre se aprecian los peroxisomas bien formados. Sin embargo, estas imágenes no permiten extraer conclusiones claras acerca del desarrollo de la red mitocondrial (en rojo) bajo estrés osmótico en ausencia de peroxisomas, por lo que futuras investigaciones serían necesarias para esclarecer este aspecto.

4.1.2 Visualización de la mitocondria con GFP bajo estrés osmótico

Dado que de la visualización con dsRed de la mitocondria no se pudieron extraer conclusiones claras, se procedió a repetir el experimento transformando las cepas silvestre y mutantes de delección únicamente con el plásmido pVT100U-mtGFP, ya que resultados anteriores del laboratorio determinaron que esta estrategia funcionaba mejor a la hora de marcar la morfología de la red mitocondrial en verde.

Se realizó un ensayo mediante microscopía confocal para analizar el cambio de morfología de la red mitocondrial bajo condiciones de estrés osmótico en las cepas WT y los mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ (Fig. 4). De acuerdo con resultados observados anteriormente en nuestro laboratorio esperábamos visualizar un aumento de la red mitocondrial tras el tratamiento con 1M de NaCl en la cepa WT (Martínez-Pastor, 2011). Sin embargo, si la hipótesis de que los peroxisomas son indispensables para la adaptación al estrés osmótico llevada a cabo por la red mitocondrial es cierta, los mutantes de delección no mostrarían dicho aumento.

Los resultados mostrados en la Figura 4 no permiten extraer conclusiones certeras acerca de la implicación de los peroxisomas en el desarrollo de la red mitocondrial en cepa WT y mutantes tras tratamiento osmótico, por lo que la hipótesis queda sin resolver. Sin embargo, sí que se demuestra el aumento de la red mitocondrial bajo condiciones de estrés osmótico, como se había observado anteriormente (Martínez-Pastor, 2011). Esta ambigüedad se puede explicar por el hecho de que, dentro de una misma población de células de levadura bajo tratamiento salino, cada una puede responder en mayor o menor grado al estrés aplicado, por lo que resulta complicado extraer conclusiones sólidas a partir de los resultados obtenidos. Esta heterogeneidad en la elaboración de una respuesta puede deberse a factores como la densidad celular en un punto determinado, la fase del ciclo celular, la abundancia de nutrientes, etc.

Dado que esta aproximación resultó infructuosa, se decidió realizar un ensayo bioquímico más robusto a la hora de aportar conclusiones. En este ensayo se decidió analizar la actividad de la enzima SDH, como indicador de la tasa de respiración mitocondrial.

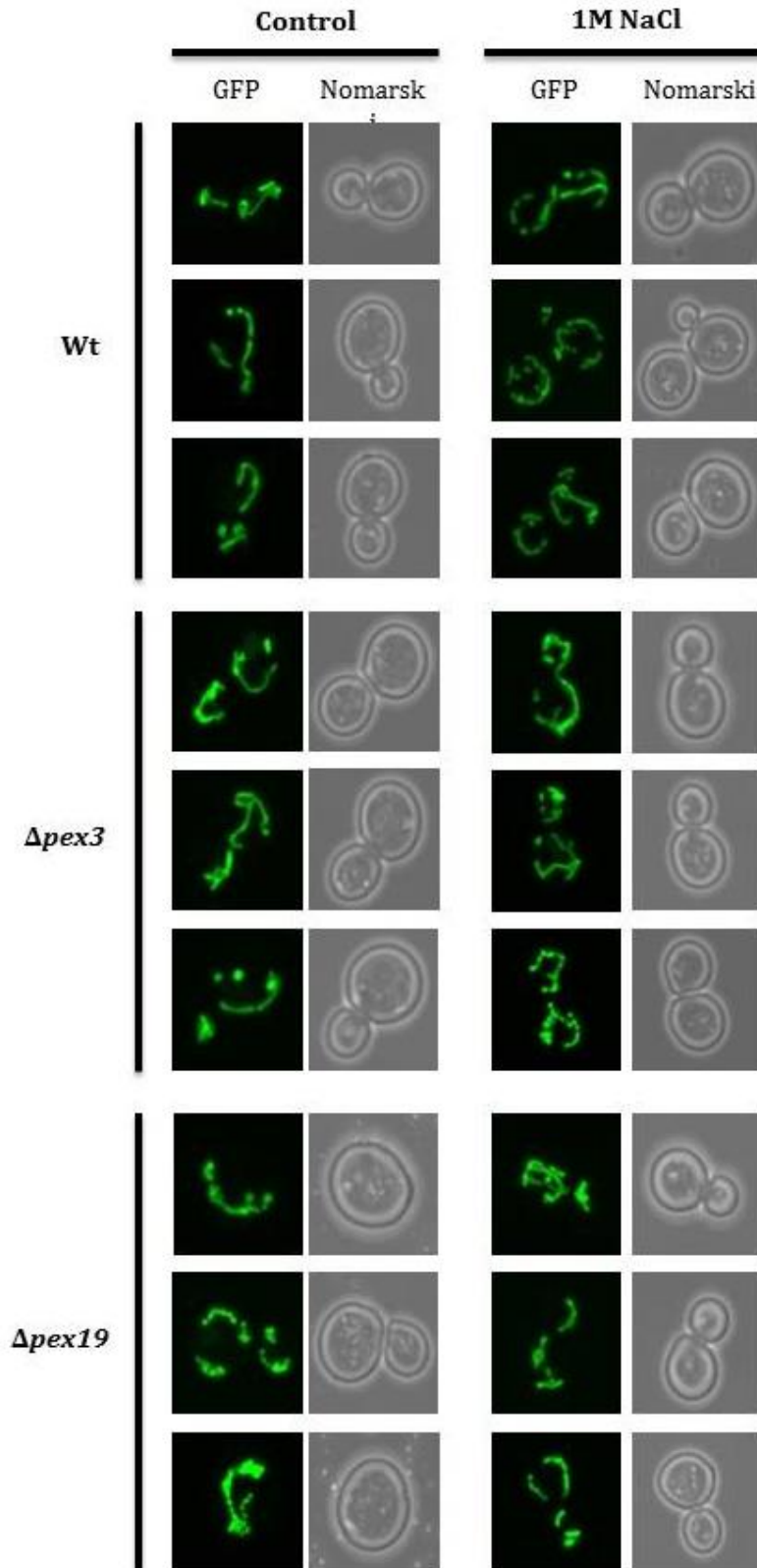


Figura 4. Visualización de la mitocondria con GFP bajo estrés osmótico. Se visualizó la morfología y extensión de la red mitocondrial (en verde) en condiciones control (sin estrés) y con estrés salino (1M NaCl) “overnight” en las cepas Wt (BY4741), $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ de *S. cerevisiae* transformadas con pVT100U-mtGFP. En la figura se muestra la imagen de la red mitocondrial (GFP), visible gracias al GFP en microscopia de fluorescencia, y la imagen transmitida de las células de levadura (Nomarski).

4.2 FUNCIÓN DE LOS PEROXISOMAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

4.2.1 Actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta a estrés osmótico en levadura

La actividad de la SDH se emplea como marcador de la actividad mitocondrial. Partiendo del hecho constatado de que dicha actividad aumenta ante un estrés osmótico en la cepa WT (Martinez, Proft and Pascual-Ahuir, 2009), en este trabajo se pretende concretar el comportamiento de las cepas mutantes de delección $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ en estas condiciones. Dado que estas cepas mutantes carecen de genes esenciales para la correcta biogénesis de los peroxisomas (Eckert and Erdmann, 2003), si estos fuesen necesarios para la correcta respuesta a estrés osmótico llevada a cabo por la mitocondria, no se observaría la misma respuesta que en la cepa WT.

En este experimento se midió por duplicado la actividad de la SDH del extracto proteico de células de las cepas silvestre y mutantes $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ a las 0 y 2 horas del tratamiento con 0,4 M de NaCl. Los resultados se relativizaron arbitrariamente a 1, tomando como valor de referencia el de cada una de las cepas a las 0 horas de tratamiento (Fig. 5).

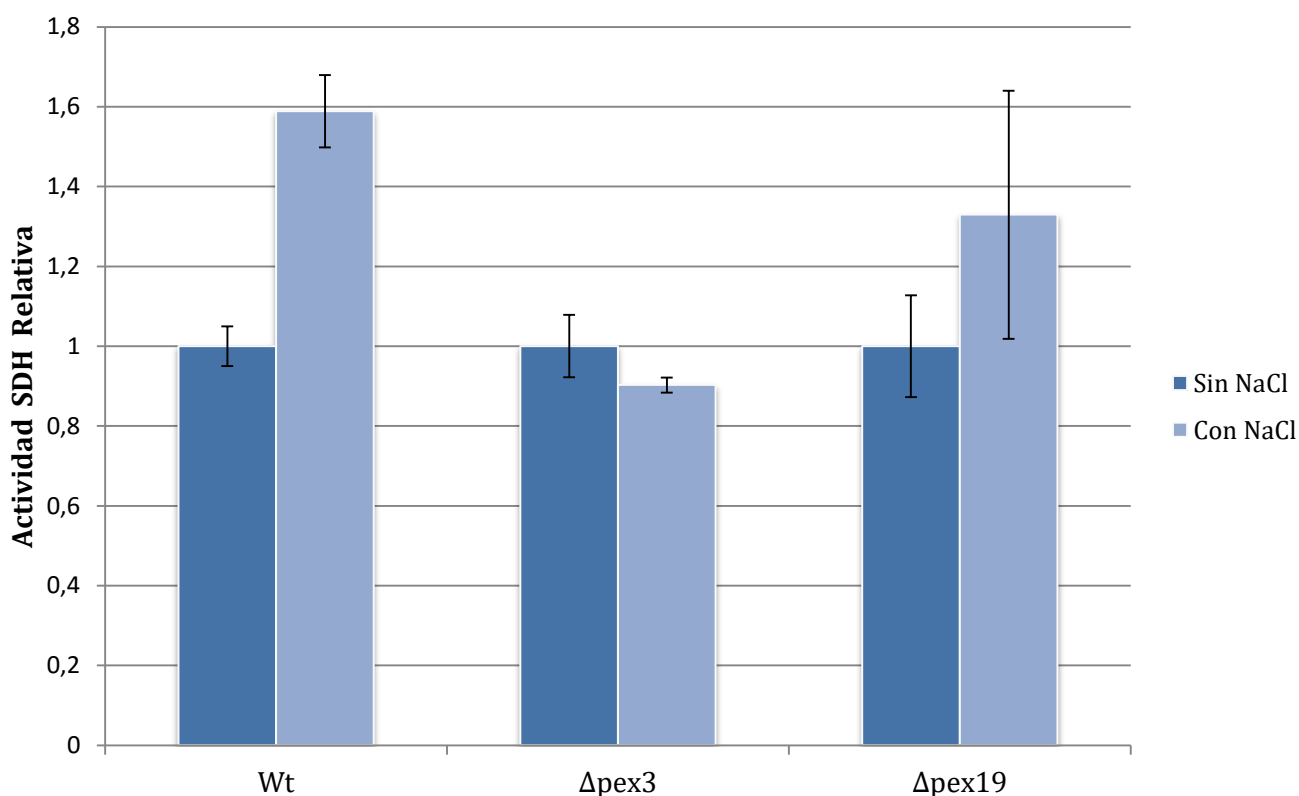


Figura 5. Actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta a estrés osmótico en levadura. Cuantificación de la actividad relativa de la enzima mitocondrial SDH en las cepas de *S. cerevisiae* Wt (BY4741), $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ a las 0 (sin NaCl) y 2 horas tras el tratamiento con 0,4M de NaCl (con NaCl). Se estableció 1 de forma arbitraria como valor de la actividad SDH de las cepas sin haber sido sometidas al tratamiento salino y se relativizaron los demás valores teniendo en cuenta esta cifra. La actividad SDH fue medida por duplicado para cada una de las cepas.

Por una parte, se corroboran los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Martinez-Pastor, 2011) en relación a la cepa WT. En esta cepa se puede observar un aumento de la actividad SDH tras el tratamiento osmótico durante 2 horas, lo que indica que la célula en su adaptación al estrés aumenta la respiración mitocondrial. En sus resultados se puede observar un aumento de hasta 2,5 veces tras 2 horas bajo estrés salino (Fig. 1) mientras que en nuestro análisis se observa un incremento un poco menor de la actividad enzimática SDH relativa, de 1,6 veces. Esto puede deberse a que en su caso se utilizó un extracto proteico enriquecido en la fracción mitocondrial mientras que en el nuestro se utilizó un extracto proteico global de todo el contenido celular.

Por otra parte, los diferentes mutantes mostraron comportamientos distintos. De los resultados obtenidos con la cepa $\Delta pex3$ se puede deducir que la actividad SDH no aumenta tras la aplicación del estrés osmótico, mientras que en cepa $\Delta pex19$, aunque se puede observar una tendencia hacia la disminución de la actividad enzimática, la desviación típica entre los resultados es demasiado elevada como para extraer conclusiones (Fig 5). La falta de aumento en la actividad de la SDH en la cepa $\Delta pex3$ podría explicar que los peroxisomas están implicados en la respuesta mitocondrial al estrés, ya que estos orgánulos están relacionados metabólicamente y de algún modo esta interacción es necesaria.

Se podrían diseñar futuros experimentos para tratar de esclarecer los resultados obtenidos en este ensayo, como por ejemplo repetir la medición de la actividad SDH en la cepa $\Delta pex19$ con tal de disminuir el error obtenido entre las distintas mediciones. Si la hipótesis de que los peroxisomas son necesarios en la adaptación a estrés osmótico es correcta, esperaríamos obtener un resultado similar al de la cepa $\Delta pex3$, ya que ambas son deficientes en genes de la ruta de biogénesis peroxisomal. Mediante un ensayo de complementación, transformando las cepas mutantes con los genes que han sido suprimidos, se podría comprobar si estas recuperan el fenotipo de la cepa silvestre, corroborando así la hipótesis.

Una vez comprobada la interacción metabólica entre los peroxisomas y la mitocondria en respuesta a estrés osmótico, se decidió estudiar si también existía una interacción física y si esta aumenta en respuesta a osmoestrés. Por ello se analizaron bajo microscopía confocal las distintas cepas cotransformadas con los plásmidos pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed tal y como se explica en el siguiente apartado.

4.3 ESTUDIO DE LA COLOCALIZACIÓN DE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIA

4.3.1 Aumento del número de peroxisomas y colocalización con mitocondria en respuesta a estrés salino.

Se realizó un ensayo de microscopía confocal con el objetivo de analizar, por una parte, el número de peroxisomas, y por otra, un posible aumento de colocalización con la red mitocondrial tras aplicar estrés osmótico. Esto fue posible gracias al empleo de los plásmidos pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed, los cuales permiten visualizar los peroxisomas en verde y la red mitocondrial en rojo respectivamente.

En un inicio se evaluó la posibilidad de utilizar la combinación de plásmidos pVT100U-mtGFP y pTPI1-HcRed-PTS1, ya que el plásmido pVT100U-mtGFP funciona muy bien a la hora de marcar la mitocondria en verde (con GFP). Sin embargo, cuando se realizó una primera visualización de la cepa WT, transformada con estos dos plásmidos, bajo microscopía confocal en condiciones normales, se observó un número de peroxisomas mucho menor al esperado. Tal y como se muestra en la Figura 6, las células presentan unos dos o tres preoxisomas, mientras que en resultados obtenidos por nuestro grupo se contabilizaban una media de seis peroxisomas por célula en las mismas condiciones (Manzanares, Proft and Pascual-Ahuir, observaciones no publicadas).

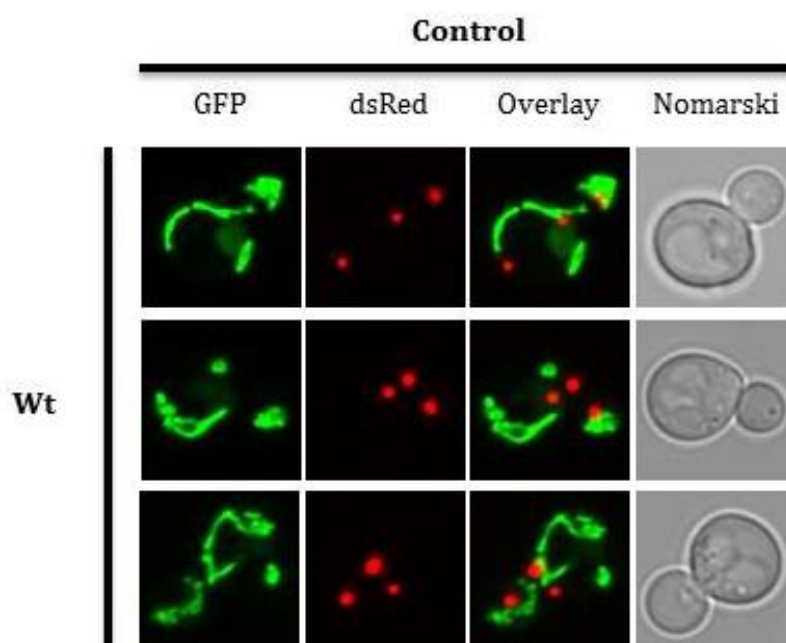


Figura 6. Visualización de la cepa Wt (BY4741) de *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos pVT100U-mtGFP y pTPI1-HcRed-PTS1 en condiciones control (sin estrés). En la figura se muestra la red mitocondrial en verde (GFP), los peroxisomas en rojo (HcRed), la superposición de estos dos canales (Overlay) y la imagen transmitida de las células de levadura (Nomarski).

Ya que en los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio se utilizó el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 para visualizar exclusivamente los peroxisomas, se decidió utilizar la combinación pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed para visualizar los dos orgánulos bajo microscopía confocal con tal de ser coherentes con la metodología y los resultados obtenidos anteriormente. Este fenómeno resulta curioso, ya que tanto el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 como pTPI1-HcRed-PTS1 presentan los mismos promotores y el mismo péptido de señalización peroxisomal fusionado a distintos fluoróforos. La razón por la que las células no se comportan de la misma forma y presentan un número de peroxisomas distinto dependiendo de con que plásmido estén transformadas sigue sin estar clara, sin embargo se prosiguieron los experimentos con la combinación pTPI1-GFP-PTS1 y pAG415-GPD-Om14-dsRed ya que las células transformadas con estos dos plásmidos se comportaban de forma más coherente con los resultados obtenidos por nuestro grupo anteriormente.

Una vez dejada clara qué metodología era más conveniente seguir, se empleó la cepa WT cotransformada con los plásmidos nombrados anteriormente y se evaluó la localización y el número de peroxisomas en condiciones control (sin tratamiento) y tras aplicar 1M de NaCl “overnight” (Fig. 7). Las imágenes obtenidas parecen mostrar un aumento del número de peroxisomas en la adaptación al osmoestrés, así que para confirmar este resultado se analizaron cuantitativamente las señales en verde y se realizó un estudio estadístico (Fig. 8).

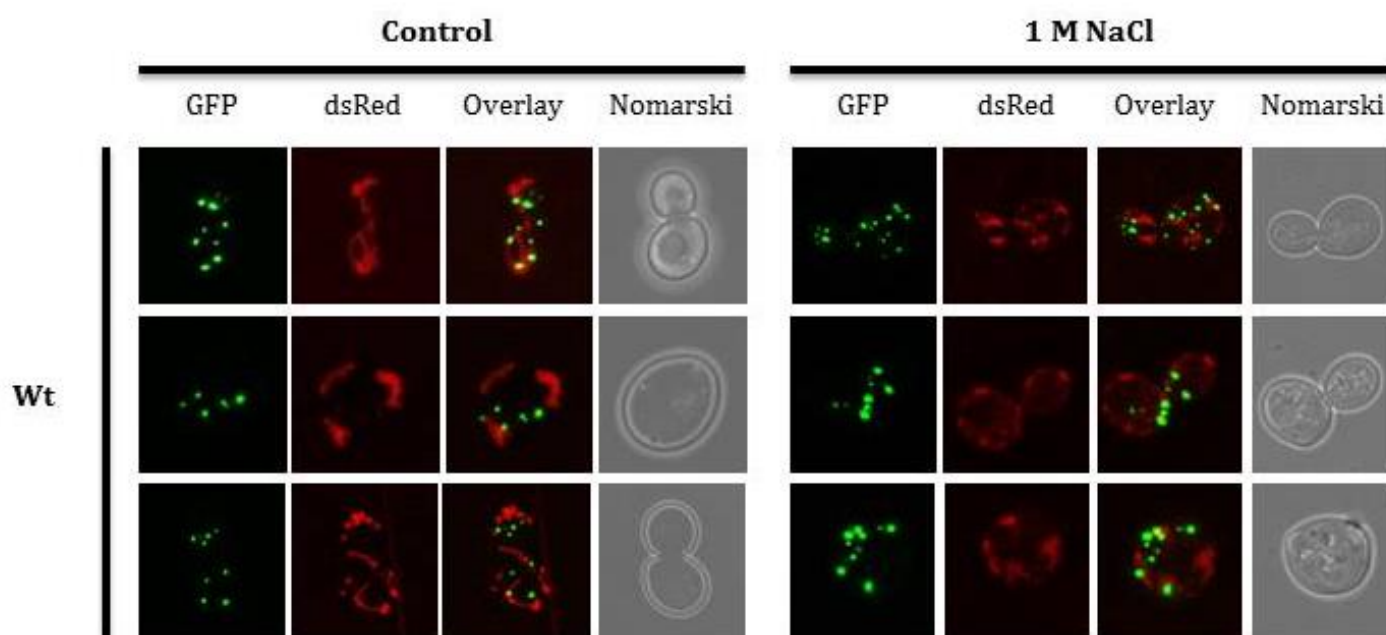


Figura 7. Visualización de los peroxisomas y la red mitocondrial de la cepa silvestre en condiciones control y bajo estrés salino. Se visualizó bajo microscopía confocal de los peroxisomas (GFP) y la red mitocondrial (dsRed) de la cepa de levadura Wt (BY4741) transformada con los plásmidos pAG415-GPD-Om14-dsRed y pTPI1-GFP-PTS1, en condiciones normales (Control) y tras un tratamiento salino “overnight” con 1 M NaCl. En la figura se muestra también la superposición de los canales GFP y dsRed (Overlay) además de la imagen transmitida de las células de levadura (Nomarski).

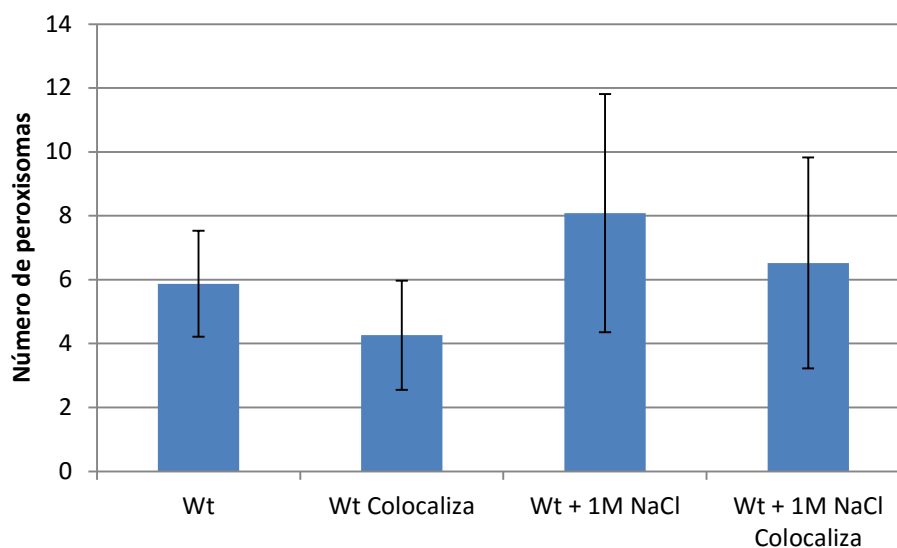


Figura 8. Conteo del número de peroxisomas de las células de levadura Wt. Se contabilizó el número de peroxisomas de las células de levadura de la cepa silvestre (BY4741) transformadas con pAG415-GPD-Om14-dsRed y pTPI1-GFP-PTS1 que se muestran en la Figura 7, antes y tras un tratamiento salino con 1M NaCl “overnight”. En la figura se muestra el número de peroxisomas promedio de 50 células de levadura distintas antes y después del tratamiento junto con los peroxisomas que colocalizan con la red mitocondrial.

Los resultados de la indican un aumento tanto del número de peroxisomas en la célula como de su colocalización con la red mitocondrial bajo estrés salino, aumentando esta última de un 73 % en condiciones normales a un 80 % tras el tratamiento (Fig. 8). Sin embargo, el análisis estadístico muestra una alta desviación entre los resultados para cada cepa, por tanto, para poder extraer conclusiones definitivas se debería repetir el conteo de peroxisomas aumentando la población de células a analizar para tratar de disminuir el error.

5. Consideraciones Finales

5. CONSIDERACIONES FINALES

Tras la observación de todos estos resultados, surgen las preguntas: ¿Que implica la interconexión peroxisoma-mitocondria? ¿Por qué se incrementa bajo condiciones de estrés osmótico? Por una parte, el acetyl-CoA se transporta de los peroxisomas a la mitocondria cuando la célula empieza a respirar. Por alguna razón desconocida, durante el estrés, esta respiración se incrementa. Esto puede estar relacionado con el aumento del estrés oxidativo, ya que una cadena funcional respiratoria es necesaria para detoxificar ROS, aunque es más probable que el incremento de la respiración mitocondrial se deba a un aumento de las necesidades energéticas de la célula, ya que las funciones de adaptación al estrés consumen ATP. Por ejemplo la propia biosíntesis de glicerol (principal molécula osmoprotectora en la célula de levadura), en la que se consume metabolitos de la glicólisis, provoca la disminución del rendimiento de esta, dando lugar a una producción menor de energía. Por otra parte, otra posible causa de la disminución de la energía disponible en la célula, sería que el propio estrés salino inhibe de alguna forma la toma de azúcares por parte de la célula. Por tanto, durante un choque osmótico, podría ser necesario un cambio de fermentación a respiración para subir el “pool” de ATP y obtener más energía.

Además, observaciones recientes en el laboratorio demuestran un aumento generalizado de la expresión de los genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos y el transporte del acetyl-CoA a la mitocondria (Manzanares, Proft and Pascual-Ahuir, observaciones no publicadas) bajo osmoestrés. Esto indica que en el peroxisoma adaptado al estrés se consumen más ácidos grasos, probablemente para aportar más energía a la célula y respalda la idea de que peroxisomas y mitocondria interactúan para producir esa energía de más que requiere la célula para activar los mecanismos de respuesta a estrés. Incluso el aumento de la mitocondria podría darse gracias al aumento de los peroxisomas.

En resumen, parece que el problema de la célula en su proceso de adaptación a osmoestrés sería energético, por eso se incrementa la transcripción de todos los genes relacionados con la β -oxidación (Manzanares, Proft and Pascual-Ahuir, observaciones no publicadas) y aumenta la respiración mitocondrial, para aumentar la cantidad de ATP disponible en la célula y poder satisfacer las necesidades energéticas del propio sistema de adaptación. Además, como se conoce el hecho de que el estrés osmótico causa estrés oxidativo (Tomanek, 2015), mitocondria y peroxisomas aumentarían física y metabólicamente para hacer frente a un aumento de ROS además de para producir más energía.

En este trabajo hemos visto el fenotipo que subyace a la adaptación a estrés salino, descubriendo que los peroxisomas están involucrados en la inducción de la respiración para la supervivencia a las condiciones de hiperosmolaridad del medio. En futuros experimentos resultaría muy interesante estudiar los mecanismos que controlan esta respuesta. Por ejemplo, una posible aproximación futura sería el estudio a nivel transcripcional de la expresión de los genes peroxisomales, poniendo especial atención en la ruta HOG, ya que quizá, al ser la ruta que está al cargo de la adaptación a osmoestrés, interviene de alguna forma en la regulación de la expresión de los mismos. Otro punto que resultaría interesante abordar sería el mecanismo de duplicación de peroxisomas en respuesta a estrés osmótico, ya que se sabe que existen dos rutas distintas, una síntesis

de novo y una en la que se produce la fisión de los peroxisomas ya existentes, pero no se conoce como la célula decide que ruta tomar o por qué.

En definitiva este trabajo ha servido para aportar un poco más de luz en el complicado proceso de adaptación y regulación de la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*, del cual aún se desconocen muchos factores y seguro que resulta objeto de estudio en numerosas investigaciones futuras.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Tras haber analizado la interacción peroxisomal-mitocondrial en condiciones de estrés osmótico, las conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo son:

- Los peroxisomas están implicados en la adaptación a estrés osmótico.
- La red mitocondrial y el número de peroxisomas aumentan en respuesta a estrés osmótico, y los peroxisomas están involucrados en el aumento de la actividad bioquímica de la mitocondria en respuesta a osmoestrés. Específicamente, la función peroxisomal es necesaria para el incremento de la actividad de la enzima SDH del ciclo de Krebs mitocondrial durante la adaptación a estrés salino.
- En condiciones normales, peroxisomas y mitocondria colocalizan en células de levadura en un porcentaje elevado. En condiciones de estrés salino, el número de peroxisomas por célula aumenta y, además, existe un ligero aumento de la colocalización de los peroxisomas con la red mitocondrial.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Ast, J., Stiebler, A., Freitag, J. and Bölker, M. (2013). Dual targeting of peroxisomal proteins. *Frontiers in Physiology*, 4, pp.297.
- Berlett, B. and Stadtman, E. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), pp.20313-20316.
- Blomberg, A., and L. Adler. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advanced Microbial Physiology*, 33, pp.145-212
- Braverman, N., D'Agostino, M. and MacLean, G. (2013). Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 17(3), pp.187-196.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 131, pp.1-87.
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C., Kobayashi, G., Horvath, I., Vigh, L. and Maresca, B. (1996). Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), pp.3870-3875.
- Chan, D. (2006). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*, 125(7), pp.1241-1252.
- Cohen, Y., Klug, Y., Dimitrov, L., Erez, Z., Chuartzman, S., Elinger, D., Yofe, I., Soliman, K., Gärtner, J., Thoms, S., Schekman, R., Elbaz-Alon, Y., Zalckvar, E. and Schuldiner, M. (2014). Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Molecular BioSystems*, 10(7), pp.1742-1748.
- Davies, M. (1987). Applications of electron spin resonance spectroscopy to the identification of radicals produced during lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), pp.149-173.
- Dean, R., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*, 324(1), pp.1-18.
- Detmer, S. and Chan, D. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), pp.870-879.
- Eckert, J. and Erdmann, R. (2003). Peroxisome biogenesis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 147, pp.75-121.

- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440(3), pp.325-331.
- Gietz, R., Schiestl, R., Willems, A. and Woods, R. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4), pp.355-360.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), pp.300-372.
- Jamieson, D. J. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptative responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, 174 (20), pp.6678-6681.
- Laroche, C., Beney, L., Marechal, P. and Gervais, P. (2001). The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), pp.249-254.
- Martínez-Pastor, M. (2011). *Análisis de la función y la regulación de la mitocondria de la levadura Saccharomyces cerevisiae en respuesta a estrés osmótico*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Martínez-Pastor, M., Proft, M. and Pascual-Ahuir, A. (2009). Mitochondrial Function Is an Inducible Determinant of Osmotic Stress Adaptation in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), pp.30307-30317.
- Martínez-Pastor, M., Proft, M. and Pascual-Ahuir, A. (2010). Adaptive Changes of the Yeast Mitochondrial Proteome in Response to Salt Stress. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(5), pp.541-552.
- Matsuyama, S. and Reed, J. (2000). Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death and Differentiation*, 7(12), pp.1155-1165.
- Mohanty, A. and McBride, H. (2013). Emerging roles of mitochondria in the evolution, biogenesis, and function of peroxisomes. *Frontiers in Physiology*, 4, pp.268.
- Neuspiel, M., Schauss, A., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R., Andrade-Navarro, M. and McBride, H. (2008). Cargo-Selected Transport from the Mitochondria to Peroxisomes Is Mediated by Vesicular Carriers. *Current Biology*, 18(2), pp.102-108.
- Schüller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., & Ruis, H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO Journal*, 13(18), 4382-4389.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*, 165, pp.1-52.
- Skoog, D., Holler, F. and Nieman, T. (1998). *Principles of instrumental analysis*. Philadelphia: Saunders College Pub.
- Smith, J. and Aitchison, J. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), pp.803-817.

- Stevens, T. H. and Chan, S. I. (1981) *Histidine is the axial ligand to cytochrome alpha 3 in cytochrome c oxidase. Journal of Biological Chemistry*, 256 (3). pp.1069-1071.
- Thoms, S., Grønborg, S. and Gärtner, J. (2009). Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 15(7), pp.293-302.
- Tomanek, L. (2015). Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), pp.1867-1879.
- Wanders, R. and Waterham, H. (2006). Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp.295-332.
- Westermann, B. and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15), pp.1421-1427.
- Wood, J. (2006). Osmosensing by Bacteria. *Science's STKE*, 2006(357), pp.pe43-pe43.